

## 論文の内容の要旨

論文題目 Study of Liquid Chromatography Using Extended Nanospace  
(拡張ナノ空間を用いた液体クロマトグラフィーの研究)

氏名 石橋 亮

### 1. 緒言

近年、単一細胞プロテオミクス等において、極微小試料を高分離効率、高速で分離可能なデバイスが求められている。ここで、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は最も一般的な分離手法である。しかし、現状の充填粒子を用いたクロマトグラフィーには限界があり、単一細胞体積 (pL オーダー) 以下の試料を高分離効率、高速で分離可能なクロマトグラフは存在しない。一方、当研究室では数十~数百 nm スケール (拡張ナノ空間) のチャンネルの加工法や圧力流体制御法を確立し、微小空間を活かしたアプリケーションも開発してきた。また、拡張ナノ空間内の水 (プロトン性溶媒) はバルク水に比べて高粘度、低誘電率であることなどの特異的な性質も報告してきた。このような拡張ナノ空間は体積が aL オーダーと小さく、比界面積が大きいので、充填粒子を用いずにチャンネル壁面を固定相とみなしてクロマトグラフィー分離が可能であると着想した。これにより、従来の HPLC の限界を打破する、aL オーダーの超微量な試料を高分離効率、高速で分離可能なデバイスが可能であると考えた。また、拡張ナノ空間に特異的な物性を活かした、新しい原理での分離も期待できる。しかしこれらを達成するためには、バルクやマイクロ空間に比べて拡散が支配的な拡張ナノ空間での aL オーダーの試料のインジェクションや、未開拓の拡張ナノ空間内での分離現象の解明や分離性能の評価が必要である。

そこで本研究では、aL オーダーの試料を高分離効率、高速で分離可能な、拡張ナノ空間を用いた革新的なクロマトグラフィーの確立を目指す。具体的には 1) aL オーダーの試料インジェクションのための新規流体制御システムの開発、2) 拡張ナノ空間を用いたクロマトグラフィーの確立と分離性能の評価、3) 拡張ナノ空間の特異性が誘起される水系移動相を用いた分離への展開について取り組んだ。

### 2. aL オーダーの試料インジェクションのための新規流体制御システムの開発

#### 2-1. 原理：拡張ナノ空間内の aL オーダー試料のインジェクション

圧力駆動流を用いたインジェクション手法を図 1 に示す。三方向から同じ圧力を加えることにより試料をローディングし、続いて右側の圧力を大気開放し、一定の時間 ( $\Delta t$ ) 後に上側の圧力を開放し、試料を分離チャンネルにインジェクションした。既存のシステムでは、この圧力の切り替えが 1 秒のオーダーであった。ここで、試料バンドは 1 秒間に数 10  $\mu\text{m}$  拡散し、マイクロチャンネルではこの拡散による影響は無いが、チャンネル幅が数 100 nm の拡張ナノ空間では大きく影響する (図 1)。よって、拡散が支配的な拡張ナノチャンネルでインジェクションを行うためには、圧力切り替えが速い新規流体制御システムが必要である。

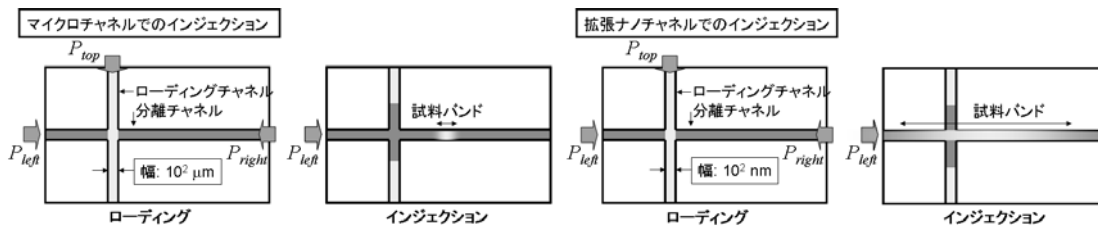


図 1. インジェクション法と拡散

## 2-2. aL インジェクションのための流体制御デバイスの開発

まず、拡張ナノチャネルの両端をマイクロチャネルで挟み込む設計にし、確実に迅速な溶液置換が可能であると考えた (図 2 a)。

圧力制御システムは、コンプレッサーで発生させた圧力をタンクに最大 4 MPa 溜め、ソレノイドバルブを 10 ミリ秒以内で開閉することにより圧力の印加を制御した (図 2 b)。さらに、ソレノイドバルブをシークエンサーにより制御することにより、10 ミリ秒の時間分解能で制御することを可能にした。

また、圧力損失が大きい拡張ナノチャネルで、従来の HPLC と同

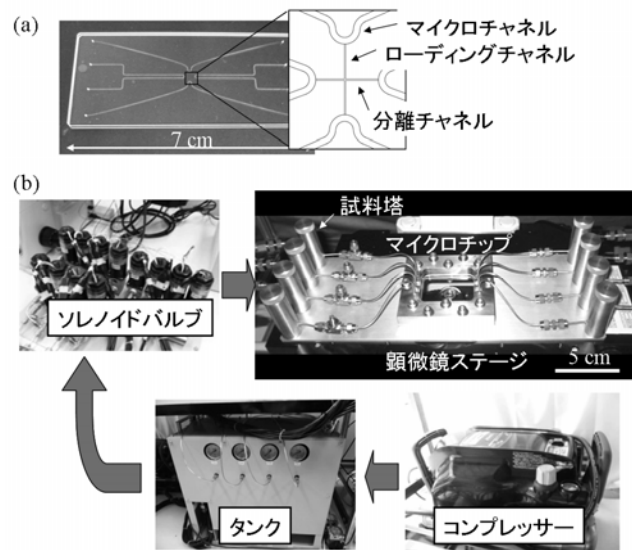


図 2. マイクロチップ (a) と流体制御システム (b)

程度の流速 ( $\text{mm s}^{-1}$ ) で解析を行うためには数 MPa 必要である。そこでチップホルダーの素材をすべてステンレスにし、配管は溶接により耐圧性を増した (図 2 b)。

## 2-3. aL 試料インジェクションの実証

深さ 200 nm、幅 900 nm、長さ 1.2 mm のローディングチャネルと分離チャネルを有する石英ガラス製のマイクロチップを用いて蛍光試料をインジェクションした。

図 3 に  $\Delta t$  を変化させた時の、インジェクションのクロマトグラムを示す。この評価法から、最小 180 aL の切り取り体積の試料インジェクションを達成したと計算される。またインジェクションの開始時間原点を確定することに成功した。

本システムによりこれまで困難であった、単一細胞の体積 (pL) よりも 6 桁小さい aL オーダー試料のインジェクションに成功した。これにより拡張ナノ空間を用いたクロマトグラフィーが初めて可能になる。

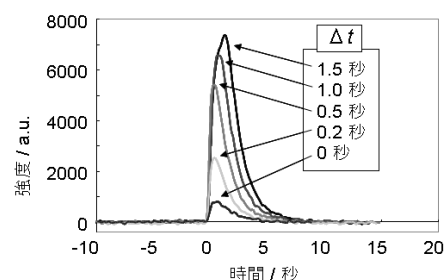


図 3.  $\Delta t$  を変化させた際のインジェクションの様子

## 3. 拡張ナノ空間を用いたクロマトグラフィーの確立と分離性能の評価

水系のプロトン性の移動相を用いた分離では、拡張ナノ空間のサイズと特異性の情報が混在し評価が困難である。そこで、非プロトン性、非極性溶媒を移動相に用いる順相系であれば拡張ナノ空間の特異性の寄与を排除し、サイズのみによる分離の評価が可能であると考えた。

### 3-1. 原理：順相クロマトグラフィーと分離の評価

順相クロマトグラフィーでは、チャンネル壁面との親水性相互作用が大きい試料程壁面に保持され遅く移動する（図4）。親水性相互作用が無い分子は保持されず移動相と同じ速度で移動し、分離がおこる。

分離効率を表す理論段高さにより分離を評価した。充填カラムを用いない系の理論段高さ  $H$  は拡散定数  $D_{mol}$ 、流速  $u$ 、チャンネル深さ  $d$ 、定数  $f_0$  を用いて以下のように表される。

$$H = \frac{2D_{mol}}{u} + \frac{f_0}{105} \cdot \frac{d^2}{D_{mol}} \cdot u \quad (1)$$

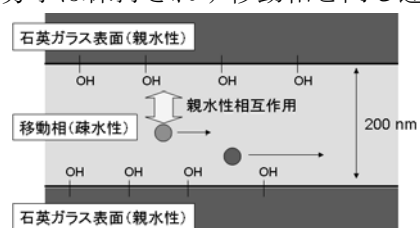


図4. 順相クロマトグラフィーの原理

式1と実験結果を比較することで、現象の解明や性能を評価する。

### 3-2. 順相クロマトグラフィーの分離と評価

固定相としてチャンネル壁面（シラノール表面）、移動相としてトルエン、試料に Pyrromethene 597 (P597) と Coumarin 460 (C460) を用いた順相クロマトグラフィー分離をした。2 試料の混合溶媒をインジェクションし、インジェクション部から 1100  $\mu\text{m}$  地点で得た4回の試行のクロマトグラムを図5に示す。2つの試料は再現的に分離され、従来の充填カラムを用いた HPLC よりも 11 桁小さい試料量（数 fL）のインジェクション試料を、2 桁速い分離時間（4 秒）での分離を達成した（表1）。

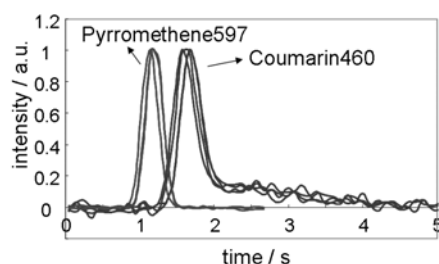


図5. 順相モードによる混合試料のクロマトグラム

この分離の評価をするための Van Deemter プロットを図6に示す。最小の理論段高さは 2.3  $\mu\text{m}$  であり、分離効率としての理論段数は 440,000 段/m であった。これは HPLC の結果よりも一桁大きい値である。また、実験結果が理論（式1）に合致したことから、この高効率な分離は、チャンネル深さ方向へ拡散する時間が十分に速く無視できることに起因することが分かった。また、式1を用いて拡張ナノ空間を用いたクロマトグラフィーに内在する最大の分離効率が 7,000,000 段/m と算出でき、従来の HPLC よりも 2 桁大きい分離効率のポテンシャルがあることが分かった。

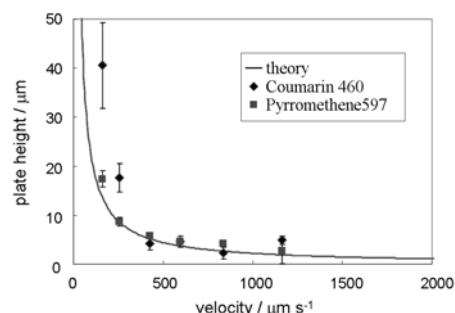


図6. Van Deemter プロット

本手法は試料量、分離時間、分離効率において従来の充填カラムを用いた HPLC の限界を桁単位で突破する革新的な分離デバイスである。また、分離が理論と合致したことから分離効率を設計することが可能になる。実際に、分離チャンネルを 1.2 から 5.2 mm に、チャンネル深さを 200 から 400 nm に増やし、総理論段数（理論段数にチャンネルの長さかけた値）を HPLC と同等の  $10^3$  段となるように設計した。その結果、図5、6では 700 段であ

った総理論段数が、2,100 段の高い分離能となることを実証した。

表 1. 分離性能の比較

	インジェクション量	分離時間	最大理論段数
カラムHPLC	10 $\mu$ L ( $10^{-5}$ L)	600 s	45,000 / m
本研究	180 aL ( $10^{-16}$ L)	4 s	440,000 / m (ポテンシャル: 7,000,000 / m)

#### 4. 拡張ナノ空間の特異性が誘起される水系移動相を用いた分離への展開

本項では水系溶媒を用いた親水性相互作用 (HILIC) モードと逆相モードを行い、拡張ナノ空間の特異的な現象について考察する。

##### 4-1. HILIC による分離

固定相としてチャンネル壁面 (親水性)、移動相として水 : アセトニトリル = 20 : 80 (親水性)、試料として Fluorescein (Flu) と Sulforhodamine B (SRB) を用いた際、4 秒以内の分離が達成された。この分離の Van Deemter プロットを図 7 に示す。実験値が理論値よりも小さい値をとり、理論よりもバンドの広がりが抑制されていることが示唆された。これは、拡張ナノ空間の特異性により流速分布が理論からずれ、Van Deemter 理論が崩れることに起因することが考えられるが、今後原因を解明していく。

##### 4-2. 逆相クロマトグラフィーによる分離

一般的にタンパク質は、親水性の移動相と疎水性の固定相を用いる逆相クロマトグラフィーで分離する。そこで、チャンネル壁面を Trimethylsilyl (TMS) 基で疎水修飾し逆相クロマトグラフィーをした。Flu と SRB を用いた分離が、TMS カラムを用いた HPLC の結果と一致したので逆相クロマトグラフィーを達成した。また、蛍光標識した BSA を用いた結果を図 8 に示す。試料バンドがピークとして検出され、拡張ナノ空間を用いたクロマトグラフィーはタンパク質にも適応可能であることが示された。タンパク質の分離の条件については今後検討する。

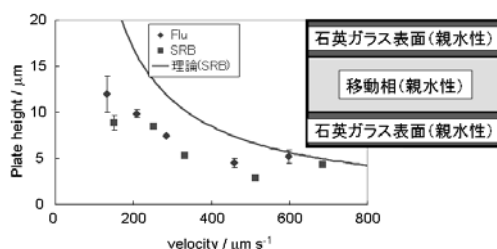


図 7. HILIC モードの Van Deemter プロット

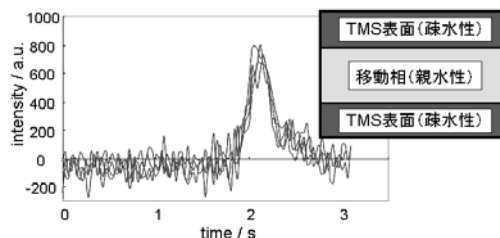


図 8. 蛍光標識 BSA の、逆相クロマトグラフィー条件でのクロマトグラム

#### 5. 結言

本研究では、拡張ナノ空間を用いた革新的なクロマトグラフィーを確立した。具体的には 1) aL オーダーの試料インジェクションのための新規流体制御システムの開発、2) 拡張ナノ空間を用いたクロマトグラフィーの確立と分離性能の評価、3) 拡張ナノ空間の特異性が誘起される水系移動相を用いた分離への展開について取り組んだ。本研究は、試料量、分離時間、分離効率のいずれにおいても従来の充填カラムを用いた HPLC の限界を桁単位で突破する革新的な分離デバイスであり、分子生物学で単一細胞の溶解液などの極微量の生体試料の分析、また超高速分離を活かして薬剤のスクリーニングの分野の発展に大きく貢献するものと期待できる。